11 月 November
2019, 62(11): 1335 – 1343
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.11.011

膜翅目昆虫的性别决定机制

王子龙[#,*], 潘露霞[#], 胡弯弯, 李 茫, 曾志将

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要: 昆虫性别决定机制存在多样性和复杂性,其中膜翅目昆虫的性别决定由单双倍体决定,单倍体为雄性,二倍体为雌性。本文就膜翅目昆虫的性别决定模式和分子机制进行综述。膜翅目昆虫性别决定有 6 种模式,即互补性性别决定(complementary sex determination, CSD)、多位点互补性性别决定(multiple-locus CSD, ml-CSD)、基因组印记、母体效应、内共生体诱导产雌单性生殖、父本遗传基因组消除(paternal genome elimination, PGE)。其中,CSD 机制是目前在膜翅目昆虫中普遍接受的性别决定模式。而蜜蜂的 CSD 性别决定机制是膜翅目昆虫性别决定模式中的典型代表,受 *csd*→*fem*→*dsx* 这一调控级联的控制。

关键词: 膜翅目; 性别决定; 互补性性别决定; 蜜蜂; 二倍体

中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2019)11-1335-09

Mechanisms of sex determination in hymenopteran insects

WANG Zi-Long[#,*], PAN Lu-Xia[#], HU Wan-Wan, LI Mang, ZENG Zhi-Jiang (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: The sex determination mechanisms of insects are diverse and complex. In hymenopteran insects, males are haploid and females diploid. In this article, we reviewed the modes and molecular mechanisms of sex determination in hymenopteran insects. Six patterns for sex determination of hymenopteran insects have been reported, including the complementary sex determination (CSD), multiple-locus hypothesis (multiple-locus CSD, ml-CSD), genomic imprinting, maternal effects, endosymbionts inducing female parthenogenesis, and paternal genome elimination (PGE). Among them, CSD is a widely accepted model of sex determination in hymenopteran insects represented by honeybees. Sex determination of honeybees is controlled by the cascade of *csd*→*fem*→*dsx*.

Key words: Hymenoptera; sex determination; complementary sex determination; honeybee; diploid

自然界中,几乎所有的高等生物及少数低等动物都存在两性现象。生物的性别决定机制存在多样性,一般可以分为两大类:一类为遗传决定机制(genetic sex-determination system, GSD),即遗传因素决定性别;另一类是环境决定机制(environmental sex-determination system, ESD),即性别决定的原始信号来自周围环境,受温度、光照、营养和种群密度等控制。昆虫的性别决定机制具有多样性。其中,膜翅目昆虫性别决定机制多样性尤为突出。在本综述中,我们对膜翅目昆虫的性别决定模式及分子机制进行了总结和评述。期待本文能对相关人员有所启发,对了解该领域最新动态有所帮助。

1 膜翅目昆虫的性别决定模式

在膜翅目昆虫中,基因、细胞质遗传和行为等因

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260584); 江西省杰出青年基金项目(2018ACB21028)
作者简介: 王子龙, 男, 1979 年 3 月生, 湖北宜昌人, 博士, 副研究员, 主要从事蜜蜂分子生物学研究, E-mail: wzlcqbb@126.com; 潘露霞, 女, 1995 年 10 月生, 新疆伊犁人, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂分子生物学研究, E-mail: panluxia1028@qq.com
[#]并列第一作者 Authors with equal contribution
[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: wzlcqbb@126.com
收稿日期 Received: 2019-05-18; 接受日期 Accepted: 2019-09-22

素均能影响性别决定，这 3 个因素通过不同的方式联系在一起。膜翅目昆虫中决定性别的主要模式是产雄孤雌生殖，在此模式中二倍体雌性由受精卵发育而来，单倍体雄性由未受精卵发育而来，在近亲繁殖条件下产生二倍体雄性。该模式中被普遍认可的性别决定机制是一种互补性性别决定(complementary sex determination, CSD)机制，这种确定物种性别的机制现已经被证实存在于 60 多个物种中(van Wilgenburg *et al.*, 2006)。图 1 系统地展示了不同昆虫性别决定途径中自我调节基因的示意图(Sawanth *et al.*, 2016)。

在蜜蜂体内介导 *csd* 的基因已被克隆出来。然而，膜翅目的 21 个亚目中只有 4 个亚目为互补性性别决定机制，有些种类的 *csd* 基因已经清楚地表明不参与性别决定。如丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的性别决定不涉及到 *csd*，但其性别决定与一种需要亲本(母本或父本)派生基因来激活雌性发育途径的基因组印记模式一致。还有些膜翅目昆虫不是产雄孤雌生殖，而是产雌单性生殖或父本遗传基因组消除(paternal genome elimination, PGE)，即雄性从受精卵发育而来，最初是二倍体，但在发育早期就失去了父系染色体的补体现象。在某些膜翅目昆虫中，由于内共生细菌介导单倍体雄性的基因组复制，使单倍体雄性转变成雌性，从而使产雄孤雌生殖模式与产雌孤雌生殖模式直接产生联系。

1.1 互补性性别决定机制

Whiting 在 1943 年提出，寄生蜂麦蛾茧蜂 *Habrobracon hebetor* 近亲交配会产生包含父系遗传的二倍体雄性后代。连锁分析表明，性别决定可追溯到一个单一的基因位点(Whiting, 1943)。根据这个发现，Whiting 推测性别决定可能发生在这种寄生蜂的一个单一位点上，这个位点为杂合子时发育为雌性，为纯合子时发育为二倍体雄性。根据这个假设，Whiting 推测总结出了一种 CSD 的遗传机制，该模式也是在膜翅目中普遍接受的性别决定模式。在群体中，性别由一个具有多个等位基因的基因座决定：在该基因座上单个个体携带不同的等位基因发育为雌性，而携带一个等位基因或相同的等位基因的个体发育为雄性。然而，某些类群如寄生蜂的性别决定，明显不能用 CSD 来解释，因为纯合子二倍体仍然发育为雌性。通过基因连锁分析已证实了与小茧蜂近源的物种的性别由一个主要的基因位点决定(Holloway *et al.*, 2000)。自从 Whiting 发现 CSD 之后，研究者们陆续在超过 60 种膜翅目昆虫中发现了 CSD (van Wilgenburg *et al.*, 2006)，其中包括一些重要经济物种，如蜜蜂、火蚁、蚂蚁、多种叶蜂和许多寄生蜂，以及一些社会性和独居性黄蜂。在自然条件下，研究发现这些具有 CSD 机制物种的二倍体雄性后代不育或者不能存活。在膜翅目中，也有许多物种不存在 CSD 机制。在这些物种中，不存在二倍体雄性或只存在不含父本遗传的二倍体雄性。研究发现 CSD 存在于原始的广腰亚目(叶蜂)、针尾亚目(蜜蜂、黄蜂、蚂蚁)和姬蜂总科(寄生蜂)中，这样的分布表明它是膜翅目中性别决定的原始机制(Cook, 1993)。Koch 等(2014)展示了 *fem* 和 *csd* 副本基因通过复制蜜蜂、大黄蜂和蚂蚁谱系中的独立基因进而反复进化，但没有检测到不同蚂蚁和蜜蜂物种之间 *fem* 和 *fem*1/*csd* 基因之间的 DNA 转移序列，相反，他们在基因组的其他位置发现了大量的基因重复现象，表明大黄蜂、蜜蜂和蚂蚁中的 *fem*1 和 *csd* 基因不是同源基因，因为它们独立于 *fem* 基因。

1.2 多位点互补性性别决定机制

多位点互补性性别决定机制(multiple-locus CSD, ml-CSD)最初由 Snell 提出，作为膜翅目昆虫中更为普遍的性别决定模式，后来由 Crozier 修改补充(Snell, 1935; Crozier, 1971)。在这种模式中，当有两个或多个独立的性位点上均为纯合子时，受精卵发育为二倍体雄性；而当至少有一个杂合性的性位点时，会导致雌性的发育。研究者在菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia vestalis* 中发现的一种产生二倍体雄性的性别决定模式，且该模式与 ml-CSD 模式一致但是和 sl-CSD 模式不同，且在红纹条三节叶蜂 *Arge nigrinodosa* 中也存在类似的模式。

ml-CSD 模式与单基因位点 CSD (sl-CSD)模式相比，二倍体雄性的比例更低，并且比 sl-CSD 更容易存在(Weis *et al.*, 2017)。并且通过二倍体雄性后代的数量很难区分 ml-CSD 模式和 sl-CSD 模式，因为二倍体雄性后代的数量还取决于近亲繁殖的水平、二倍体雄性的生存能力、以及假定的性位点之间的联系。因此，二倍体雄性后代的比例受多个因素影响。

事实上，sl-CSD 或 ml-CSD 性别决定系统的缺点是物种在近亲繁殖条件下，种群中二倍体雄性后代比例增加，二倍体雄性一般是不能生育的或不育的。不育的二倍体雄性可能不能正常交配或不能使卵子受精或可能产生不育的三倍体后代(Holloway *et al.*, 2000)，因此严重影响种群发育。所以在 CSD

的物种中应该优先进行远系繁殖。事实上许多物种与 CSD 的交配系统似乎具有远系繁殖的特征。在倾向于近亲繁衍的膜翅目种群中，自然选择更倾向于非 CSD 的性别决定机制。

1.3　基因组印记

CSD 性别决定机制不能解释所有膜翅目昆虫的性别决定机制，因为在膜翅目中有许多物种处于高水平的近亲繁殖状态（Stouthamer, 1994），且种群繁殖的性别比例高度偏向雌性，在完全纯合性的条件下偏向产雌性后代（Butcher *et al*., 2000）。例如，小蜂属寄生黄蜂 *Mellitobia* 通常情况下会进行同胞交配，在自然界中甚至会出现处女王和她自己的雄性后代交配的现象。然而，这种高度近亲繁殖的状态对这些寄生黄蜂的性别比例和卵孵化率并没有负面影响，这与 CSD 机制的预期结果相反，这种现象表明膜翅目昆虫中还存在其他的性别决定模式（Whiting, 1947）。

在丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 中，将蜂王和其雄性后代进行杂交后，其产生的 6 代后代中没有产生任何二倍体雄性后代，该结果表明 CSD 最多有 6 个独立的位点（Beukeboom and van de Zande, 2010）。在这些发现的基础上，Beukeboom 等研究者基于基因组印记建立了一种模型来解释丽蝇蛹集金小蜂的性别决定机制（Poirié *et al*., 1992; Beukeboom, 1995）。通过将父系性比（paternal sex ratio, PSR）染色体杂交到一个多倍体突变的丽蝇蛹集金小蜂家系中，研究者对染色体倍数、杂合性和受精对性别的影响进行了研究（Beukeboom and Kamping, 2006）。结果表明，雌性的发育是由父本遗传的染色体引起的，支持基因组印记模型。根据一些有关丽蝇蛹集金小蜂性别决定的研究，Beukeboom 等（2007）进一步完善了他们的基因组印记的假设模型。在新模型中，有一种母本遗传的活跃性别决定基因会印出一种合子性的性别决定基因（可能是相同的基因）。单倍体卵子只包含母本遗传基因，并因此激活性别决定基因发育为雄性。二倍体胚胎含有父本遗传的非印记基因，额外的复制性别决定基因发育为二倍体雌性。Beukeboom 等（2007）将所得数据都与这一预测模型进行了比较，并探讨了该模型是可以不受共生生物和自发的多倍性变异的影响。

1.4　母体效应

母体效应性别决定（maternal effect sex determination, MESD）最初是由 Crozier（1977）提出的。Crozier 提出胚胎的细胞核及细胞质成分决定个体的性别，单倍体胚胎中，细胞质占主要成分（母体效应）发育成雄性；二倍体胚胎中，雌位点效应高于母体效应发育成雌性（Crozier, 1977）。

丽蝇蛹集金小蜂的性别决定涉及到母体效应和基因组印记，但是参与该机制的主要基因与其他昆虫的性别决定基因是同源基因。Werren 等（1981）对丽蝇蛹集金小蜂 3 h 以内的胚胎中的 *Nvtra* 基因和 *Nvdsx* 基因进行表达分析，*Nvtra* 基因的表达水平远远高于 *Nvdsx* 基因，由此推测母本遗传的雌特异性 *Nvtra* mRNA 对雌性发育有重要作用。

二倍体胚胎中早期转录得到的 *Nvdsx* mRNA 需要经过拼接才具有翻译功能，由母体遗传的 *Nvtra* 基因可直接调控拼接过程。所以由母体遗传得到的大量 *Nvtra* 基因可确保 *Nvdsx* mRNA 的拼接及翻译进而得到足量的 *Nvdsx* 基因雌特异性蛋白，从而激活下游雌性化靶基因。Verhulst 等（2013）通过 RNAi 干扰受精的丽蝇蛹集金小蜂从而阻止母本遗传 *Nvtra* mRNA，导致 *Nvdsx* mRNA 的雌特异性剪接中断，从而导致二倍体后代发生性逆转，只产生雄性后代。此外，母体 *Nvtra* mRNA 的缺失不仅导致受精卵 *Nvdsx* mRNA 的雌特异性剪接中断，还中断了 *Nvtra* 基因本身的前体 mRNA 剪接。在丽蝇蛹集金小蜂中，*Nvtra* 基因形成了一个正反馈自动调节通路，参与调控和稳定雌性发育，对雌性发育具有关键作用（Beukeboom and van de Zande, 2010）。

Verhulst 等（2013）发现在丽蝇蛹集金小蜂未受精卵中，*Nvtra* 基因在早期胚胎发育过程中并不表达，而在二倍体受精卵中，*Nvtra* 基因大约在产卵后 7 h 开始表达；此结果表明母本遗传的 *Nvtra* 基因在单倍体中母系沉默，在二倍体中需要父系基因组启动 *Nvtra* 基因的表达，表明只要母本遗传 *Nvtra* 基因 mRNA 没有受阻，父系基因组是胚胎雌性发育所必需的；并且发现了丽蝇蛹集金小蜂的 *Nvtra* 基因需要由某个因素激活，他们将它命名为 *womanizer*（*wom*），即 *Nvtra* 基因的上游基因。

1.5　内共生体诱导产雌单性生殖

在小蜂总科和瘿蜂总科中，有文献记载有 75 种以上的物种为内共生体诱导产雌单性生殖。在这种生殖方式中，至少需要沃尔巴克氏菌 *Wolbachia pipientis* 和胞内共生菌 *Cardinium* 两种体内共生菌介导（Stouthamer *et al*., 1999; Zayed and Packer, 2005; Perlman *et al*., 2006）。在与它们有关的实验中，可以使用抗生素或热处理去除宿主昆虫体内的

共生菌,将诱导产生雄性后代,避免得到产雌单性生殖种群。在大多数情况下,内共生体诱导产雌单性生殖的机制是不可知的,但有研究发现在 3 种赤眼蜂 *Trichogramma* 中,沃尔巴克氏体能通过复制单倍体卵的整个基因组(配子复制)诱导雌性产生,从而通过二倍体化将雄性转化为雌性(Stouthamer, 1994)。另外 4 种已知配子复制的例子来自于小蜂总科和瘿蜂总科,这种诱导生殖有利于母本共生体遗传,因为它们不能通过雄性宿主传给下一代(van Wilgenburg *et al*., 2006)。

1.6 父本遗传基因组消除

父本遗传基因组消除涉及到从一种最初二倍体基因组过渡到单倍体基因组的初始过程,并且对一些昆虫的性别决定起重要的作用(Herrick and Seger, 1999)。在伪产雄单性生殖昆虫如介壳虫(scale insects)中,PGE 是雄性发育的唯一途径,而在膜翅目昆虫中,PGE 对寄主的生存并不重要,而雄性通常是由未受精卵发育而来的。在两种寄生小黄蜂丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 和赤眼蜂 *Trichogramma kaykai* 中,由一种超数染色体——B 染色体(B-chromosome)引起 PGE (Werren *et al*., 1981; Nur *et al*., 1988)。这些所谓的 PSR 染色体会导致通常本应发育为雌性的受精卵发育为雄性。在由携带 PSR 的精子受精的受精卵中,二倍体受精卵进行第一次有丝分裂时,父本遗传的染色体形成了一个致密的染色质,最终丢失。PSR 本身不受影响,并与母本染色体在细胞核中结合,而现在的单倍体胚胎发育为携带 PSR 染色体的雄性。PSR 的作用模式在丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 和赤眼蜂 *T. kaykai* 中是相似的(Stouthamer *et al*., 2001; Estrada *et al*., 2003)。

恩蚜小蜂 *Encarsia pergandiella* 是一种自寄生生物,在主要宿主(粉虱)中发育为雌性,雄性在原寄生生物蛹中发育为重寄生蜂。雄性通常不会在主宿主中发育,而如果只有主宿主,雌性处女王产卵不受限制(Hunter, 1993)。Hunter 和他的同事发现了一群恩蚜小蜂,这群蜂的雄性和雌性都是在主宿主中发育而来的。这种产生异常的原始雄性的现象是一种不依赖于父本染色体的父系遗传特性。然而,没有在该种群中检测到超数染色体,到目前为止,在恩蚜小蜂中没有明确陈述 PSR 因子的起源,但是它很可能是一个转座子或者是一种父系遗传病毒(Hunter *et al*., 1993)。

PGE 与 CSD 并不矛盾,因为它将二倍体受精卵转化为单倍体雄性后代。然而,PSR 染色体只能随机交配。因此,有利于产雌,例如局部配偶竞争或雌雄比例失调,可以促进 PSR 染色体的存在。这种情况在具有 CSD 的物种中不太可能发生,因为它们通常是异种繁殖,而且在具有 CSD 的物种中还没有发现这种诱导共生体。

2 蜜蜂性别决定分子机制

2.1 蜜蜂 *csd* 基因

在蜜蜂中,其性别决定机制为互补性性别决定机制。*csd* 基因为蜜蜂性别决定级联的最顶端基因,该基因由与果蝇 *transformer* (*tra*) 基因同源的 *feminizer* (*fem*)复制而来。杂合的 *csd* 基因产生活性蛋白诱导 *fem* mRNA 雌特异性拼接,产生的 FEM 蛋白调控下游 *doublesex* (*dsx*)基因的雌特异性拼接,最终导致雌性发育(Whiting, 1943)。

1845 年 Dzierzon 提出蜜蜂的雌性(蜂王和工蜂)由二倍体受精卵发育而来,而雄性(雄蜂)由未受精的单倍体发育而来,因此,人们认为蜜蜂的性别由染色体倍数或是否受精决定。之后研究者通过使用 RAPD-PCR 标记和多位点 DNA 指纹识别技术得到蜜蜂性位点的连锁图谱(Beye *et al*., 1994, 1996, 2003; Hunt and Page, 1994, 1995),并通过对得到的性位点两侧的两个标记进行染色体步移试验和精细的映射定位得到实际的性别决定基因,这一基因被命名为 *csd*(Hasselmann and Beye, 2006)。通过 RNA 干扰来抑制雌性蜜蜂 *csd* 的转录,导致了雌性个体的雄性发育,这为 *csd* 控制蜜蜂性别提供了确凿的证据(Hasselmann and Beye, 2006)。*csd* 基因位于一个 36 kb 的基因组区域内,由 9 个外显子组成,转录序列长度大约为 1.5 kb (Hasselmann and Beye, 2004, 2006)。其预测的氨基酸序列含有一个由重复的酰胺和酪氨酸组成的高变区(HVR),一个富含精氨酸(R)和丝氨酸(S)的 RS 域(Hasselmann and Beye, 2004, 2006)和一个脯氨酸富集区,高变区在不同等位基因之间有所不同,决定着 *csd* 等位基因的特异性。

csd 基因的纯合子在蜜蜂中的适应性都为零或接近零,这意味着在该种群中通过个体选择来维持 *csd* 等位基因多样性,而 *csd* 罕见的等位基因比普通等位基因更具有选择性优势。非同义替换是形成新的功能等位基因所必要的,而在 *csd* 基因的 RS 域内非同义替换产生的超类等位基因与这一领域功能等

位基因的差异和对新等位基因选择的历史都是一致的(Hasselmann and Beye, 2004; Cho *et al*., 2006)。

csd 位点支持低水平的重组,这一特征可能是等位基因之间长期存在差异的原因。与之相反,在性别决定位点侧翼的基因组区域的基因都具有异常高的重组率,这可能降低 *csd* 基因和邻近基因之间的潜在冲突(Beye *et al*., 1999; Hasselmann and Beye, 2006)。有研究发现,大量不常见的 *csd* 等位基因的空间分布和在种群中出现的频率都是不均匀的。Beye 等(1999), Hasselmann 和 Beye (2006)对 193 个野生蜜蜂种群的 *csd* 等位基因进行分析,发现种群中 *csd* 等位基因的重叠度显著低于 *csd* 等位基因均匀分布情况下的重叠度。有趣的是,这些不均匀分布的 *csd* 等位基因都是不常见的,只存在于单个种群或蜂场,大部分都是从未被鉴定过的。他们猜测很可能这些等位基因是最近产生的,还未传播到其他种群。Zareba 等(2017)进一步分析了两个种群中 193 个群体的 *csd* 等位基因,发现 *csd* 基因的多样性远比之前所熟知的要多,其分布不均匀可能是由于大量的非必需等位基因频繁产生的结果。考虑到高频率地产生新的 *csd* 等位基因,研究者猜测 *csd* 基因除了对蜜蜂性别决定起作用,还能监控蜜蜂繁殖过程中近交和远交之间的平衡(Yokoyama and Nei, 1979; Page and Marks, 1982)。

一些基因调控,有的存在表型特征,有的没有明显表型变化。但它们通常会成为调控"开关"的重要因子,并参与级型分化。因为对分子中间形式的基因不了解,所以对于一些因缺失基因功能进化的分子机制了解甚少。Beye 等(2013)研究了西方蜜蜂 *Apis mellifera* 76 种基因型中的 14 种,即 *csd* 基因自然序列变异的性别决定开关,研究发现在 *csd* 的特定结构域(PSD)之间,只要有 5 个以上氨基酸长度存在差异就可以诱导雌性化,并且还鉴定了一种自然进化的中间产物,其 PSD 相对于亲本等位基因只显示出 3 种氨基酸长度的差异,这种基因型表现出中间体适应性,因为它会导致有规律地死亡,并且很少诱导雌性化,因此他们认为,不完全外显是一种机制,通过这种机制,新的分子开关可以逐渐和有效地进化。

2.2　蜜蜂 *feminizer* (*fem*)基因

Hasselmann 等(2008)分离了蜜蜂的整个性别决定位点(sex determination locus, SDL)基因组区域,并鉴定了派生出 *csd* 基因的起源基因 *feminizer* (*fem*),该基因位于 *csd* 上游 12 kb 处。*fem* 基因是蜜蜂性别决定通路的关键基因,其作用为维持和稳定胚胎的雌性发育,并调控下游 *dsx* 基因发生雌特异性拼接。通过对蜜蜂合胞体胚胎进行 RNAi 抑制 *fem* 基因表达,结果表明有 74% 的雌性性腺完全分化成雄性睾丸;而 *fem* 基因受抑制的雄性无性逆转。表明 *fem* 基因的表达产物是雌性性腺分化所必需的,但对雄性发育无影响(Gempe *et al*., 2009)。*fem* 基因编码的蛋白和 CSD 蛋白一样在羧基端有一个 RS 富集域和脯氨酸富集结构域,其在氨基端也有一个 RS 富集域,但缺少 CSD 中的高变区,因此,*fem*/*csd* 基因编码的蛋白均为 SR 型蛋白,可能参与调控 RNA 拼接(Hasselmann *et al*., 2008)。

fem 基因具有性别特异性剪切模式,*fem* 基因雌雄特异性转录子的 5′端都含有 UTR 区,但下游所含外显子数不同,其雌特异性拼接含有 10 个外显子,雄特异性拼接含有 12 个外显子,由于雄特异性转录子保留了完整的外显子 3,该外显子包含一个终止密码子,导致雄性中该基因的转录有时会提前终止;在雌性中,含终止密码子的部分外显子 3 以及外显子 4 和 5 都会被剪切掉,并形成了完整的 ORF,翻译产生含 403 个氨基酸的特异活性蛋白,诱导雌性发育(Hasselmann *et al*., 2008)。

将 *fem* 基因与果蝇的 *tra* 基因进行比较,研究者发现这两个基因在性别决定通路中有同等功能,都属于 SR 型蛋白,具有相同的 RS 富集域和脯氨酸富集域,都是整个雌性发育所必需的(Hasselmann *et al*., 2008)。

2.3　蜜蜂 *transformer 2* (*Amtra2*)基因

在西方蜜蜂中,异等位基因的 CSD 蛋白介导 *fem* 基因的拼接,FEM 蛋白可直接调节 *Amdsx* 基因前体 mRNA 进行雌特异性拼接,但这两种蛋白都缺少 RNA 结合位点(RNA binding domain, RBD),表明存在一个互作的辅因子结合 RNA(Gempe and Beye, 2011)。Inga 等(2012)发现 *Amtra2* 基因参与调控 *fem* 和 *Amdsx* 基因转录子的性别特异性拼接。AmTRA2 蛋白包含一个 RBD 和两侧 RS 富集域,RBD 可直接作用前体 mRNA,而 RS 富集域提供了一个潜在的与其他蛋白互作的表面。

Amtra2 具有 6 种转录子,翻译成的蛋白质在第 1 个 RS 结构域的长度上和第 2 个 RS 结构域中有无丝氨酸的现象存在差异。*Amtra2* 基因最大的转录子 $Amtra2^{285}$ 包含 1 401 个核苷酸,5 个外显子在氨基酸编码区编码了 285 个氨基酸。这 6 种剪切变异体均无性别特异性,表明 AmTRA2 蛋白均为基础性表

达。*Amtra*2 基因的表达水平在蜜蜂蛹期会大大降低,其在性腺组织中也无性别特异性拼接,这与果蝇的 *tra*2 基因不同。Inga 等(2012)对蜜蜂早期雌性胚胎进行 RNAi 降低 *Amtra*2 基因的表达,结果发现 *Amdsx* 的雌性拼接转换成雄性拼接,而 *fem* 基因的雌性拼接不受影响。对蜜蜂早期雄性胚胎进行 RNAi, *fem* 基因的雄性拼接减弱,表明 *Amtra*2 基因是 *fem* 的雄特异性拼接所必需的。在果蝇中, *Tra*2 与 TRA 蛋白一起结合在 *dsx* 前体 mRNA 的一个 13-核苷酸基序[TC(T/A)(A/T)C(A/G)ATCAACA]上,促进产生 *dsx* 雌性转录子。*Amtra*2 作为果蝇 *tra*2 的直系同源基因, AmTRA2 蛋白可能是一个重要的辅因子,与 FEM 雌特异性蛋白一起直接调控 *Amdsx* 转录子的雌性拼接过程。在雄性中,异等位基因的 CSD 蛋白和 FEM 蛋白都缺失, AmTra2 蛋白可能增强 *fem* 转录子转化为非功能性雄性形式,当该蛋白缺失时, *fem* RNA 可能被降解并被消除。Inga 等推测 *Amtra*2 基因可能具有双重功能,既在雄性中作为一个调控者调控 *fem* 雄性拼接又在雌性中参与增强 *fem* 雌性拼接(Inga *et al*., 2012)。

2.4 蜜蜂 *doublesex* (*Amdsx*)基因

Cho 等(2007)鉴定了西方蜜蜂 *Amdsx* 基因的 4 种选择性剪接变异体,分别为 $Amdsx^B$, $Amdsx^M$, $Amdsx^{F1}$ 和 $Amdsx^{F2}$。$Amdsx^{F1}$ 是 *Amdsx* 基因的最长转录子,也是较长的雌特异性变异体,全长 3 359 nt,包含 7 个外显子; $Amdsx^{F2}$ 为较短的雌特异性变异体,全长 2 337 nt,包含 5 个外显子,其与 $Amdsx^{F1}$ 的差别在于 3′ UTR 区,因此, $Amdsx^{F1}$ 和 $Amdsx^{F2}$ 编码相同的蛋白质 Dsx^F。$Amdsx^M$ 只在雄性中表达,为雄特异性变异体,全长 2 504 个核苷酸,包含 6 个外显子,跳跃了 $Amdsx^{F1}$ 的第 5 个外显子。$Amdsx^B$ 在雌雄中均有表达,全长 1 992 个核苷酸。

AmDSX 蛋白有两个功能区域(OD1 和 OD2)对寡聚化具有重要作用。AmDSX 中 OD1/DBD 的 6 个氨基酸残基是保守的,这 6 个氨基酸对锌指的功能有重要作用(Erdman and Burtis, 1993); $AmDsx^F$ 和 $AmDsx^M$ 共享 OD2 的氨基端部分,该部分在进化时相对保守,而 OD2 的羧基端部分为 $AmDsx^F$ 特有的。

除了上述蜜蜂性别决定基因外, Cristino 等(2006)在蜜蜂中筛选出了 13 个参与果蝇性别决定的基因(>40%),其中有 8 个基因编码产生转录因子,它们为 *dsx*, *ix*, *fru*, *dpn*, *dsf*, *run*, *bab* 和 *scr*;有 3 个基因编码的蛋白参与初始信号传递(*sxl*, *tra*2 和 *fl*)和参与调控胚胎性别决定基因的选择性剪切;另外两个保守基因都参与信号转导的细胞通讯途径(*hop* 和 *pk61C*),这些信号转导途径对生殖器的形成和 *dpp*, *hh* 以及 *wg* 介导的通路非常重要。所有

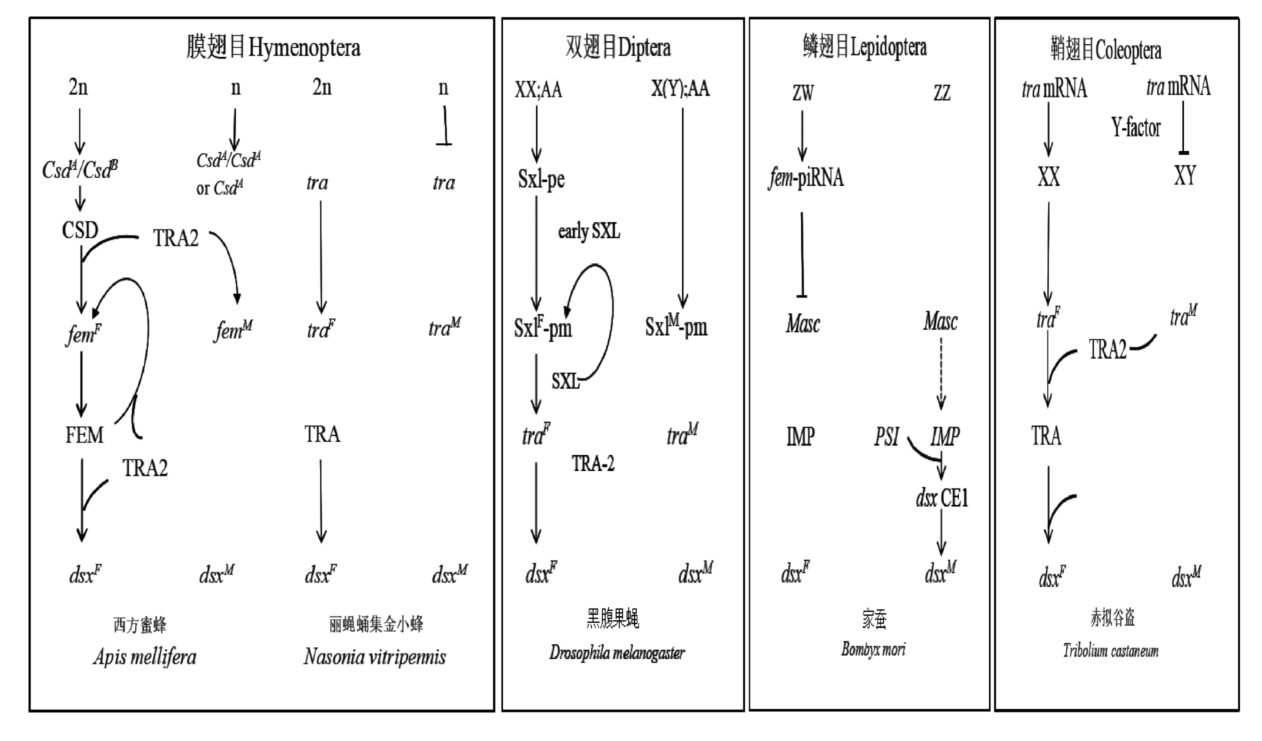


图 1 不同昆虫性别决定途径(改自 Sawanth *et al*., 2016)

Fig. 1 Sex determination pathways of various insects (adapted from Sawanth *et al*., 2016)

这些调控子对果蝇性别发育有重要作用,且有些调控子在远源物种中的结构和功能都高度保守（Estrada *et al.*, 2003）。总之,蜜蜂的雌雄性别由 *csd*→*fem*→*dsx* 形成的调控级联决定,在该级联中上一基因通过调控下游基因在雌雄中的选择性剪切来实现对性别发育的调控。

3 不同昆虫性别决定分子调控途径的比较

昆虫的性别决定模式虽然存在多种类型,但它们的分子调控途径具有一定的保守性。在膜翅目中,蜜蜂是代表性昆虫,其雌雄性别由 *csd*→*fem*→*dsx* 形成的调控级联决定,*csd* 作为初始信号,只在早期胚胎发育期诱导雌性发育,并将信号传递到下游,使胚胎朝雌性发育。在杂合子中, CSD 蛋白和 TRA2 蛋白调控 *fem* 基因的雌特异性剪接,*fem* 雌特异性剪接体产生的蛋白负责 *dsx* 的雌特异性剪接。在纯合子或半合子中,缺少具有活性的 CSD 蛋白,导致 *fem* 基因的雄特异性剪接,产生无功能的雄特异性 FEM 蛋白。

在双翅目中,黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 是代表性昆虫。其性别决定模式为单双倍数型,XX 为雌性, X(Y)为雄性。黑腹果蝇性别由 X: A→*sxl*→*tra*→*dsx* 形成的调控级联决定,性染色体 X 浓度作为初始信号调控 Sex *lethal* (*sxl*)的转录,引起胚胎雌雄发育。*sxl* 有两个不同的启动子,早期启动子(Sxl-pe）和晚期启动子（Sxl-pm）（Salz *et al.*, 1989）。Sxl-pe 只在雌性中被激活,继而导致 SXL 早期蛋白只在雌性中存在,而 Sxl-pm 在雌雄中都能被激活,并于胚胎后期开始发挥作用（Sánchez, 2008）。因此,*sxl* 的选择性剪切在雌雄中有特异性表达。

在鳞翅目中,代表性昆虫是家蚕 *Bombyx mori*。其性别决定模式为为雌异配子型,异形配子 ZW 为雌性,同型配子 ZZ 为雄性。家蚕的性别决定由 W 染色体上的雌性化因子 *fem* 控制(Hasimoto, 1933)。Kiuchi 等研究发现 W 染色体上的 *fem* piRNA 和 Z 染色体上的 *Masc* piRNA 以乒乓模式维持 *fem* piRNA 的持续产生,进而通过调控下游基因 *IMP* 和 *dsx* 在雌雄中的选择性剪切来控制雌雄的发育(Suzuki *et al.*, 2010; Kiuchi *et al.*, 2014),其中,*dsx* 雄特异性剪切由 *PSI* 和 *IMP* 这两个基因共同调节,PSI 是一个富含 KH 功能区的 RNA 结合蛋白,能与 *dsx* 的 CE1 区特异性结合共同调控 *dsx* mRNA 前体的雄特异性剪切(Suzuki, 2008)。鞘翅目的代表性昆虫为赤拟谷盗 *Tribolium castaneun*,其性别决定模式为雄异配子型,XX 为雌性, XY 为雄性。在雌性中,赤拟谷盗性别由 *tra*→*dsx* 形成的调控级联决定,*tra* 调控下游基因 *dsx* 基因在雌性中的选择性剪切,并且进行自我反馈调控,*tra2* 参与该过程。在雄性中,可能存在未知的 Y 因子,抑制 *tra* 作用,使 TRA 初期蛋白缺失,*dsx* 进行雄性剪切。

通过比较不同代表性昆虫性别决定分子机制可以看出,*dsx* 基因在所有昆虫中均高度统一,而位于 *dsx* 上游的性别决定初始信号和上游调控基因发生了改变,并且位于性别决定主干途径中的基因是通过选择性剪切来调控雌雄性别发育的。这说明昆虫的性别决定途径是从下游向上游进化的,位于性别决定途径末端的 *dsx* 是最古老的性别决定基因,而 *dsx* 上游的基因则是后来加入的。

4 结语

膜翅目昆虫性别决定模式存在多样性。其中,CSD 模式是膜翅目昆虫中普遍接受的性别决定模式。但在膜翅目中有许多物种处于高水平的近亲繁殖状态,这种近亲交配会使种群中出现二倍体雄性,这种雄性无法生育或不育,给种群发展带来不利影响,这种现象表明 CSD 性别决定机制并不能解释所有膜翅目昆虫的性别决定机制。在某些膜翅目昆虫中,由于内共生细菌介导单倍体雄性的基因组复制,使单倍体雄性转变成雌性,从而使产雄孤雌生殖模式与产雌孤雌生殖模式直接产生联系,如:没有 CSD 的丽蝇蛹集金小蜂。尽管内共生细菌诱导的产雌孤雄生殖与 CSD 完全不同,但产雌孤雄生殖也广泛存在于有 CSD 的群体(和物种)和没有 CSD 的群体中。而在近交昆虫中发现的可育二倍体雄性以及 ml-CSD 昆虫和某些没有 CSD 的昆虫的发现,说明膜翅目昆虫性别决定模式得到进一步优化,在 CSD 模式下产生的无法生育和不育的雄性现象,在一步步减少。过去十年的研究进展表明,关于膜翅目中性别决定的模式一直在不断地优化。蜜蜂是膜翅目中的代表性昆虫,对于蜜蜂性别决定分子途径中基因的研究将是膜翅目性别决定研究的重要方向。

参考文献(References)

Beukeboom LW, 1995. Sex determination in Hymenoptera: a need for

genetic and molecular studies. *BioEssays*, 17(9): 813-817.

Beukeboom LW, Kamping A, 2006. No patrigenes required for femaleness in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, 172(2): 981-989.

Beukeboom LW, Kamping A, van de Zande L, 2007. Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): a critical consideration of models and evidence. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 18(3): 371-378.

Beukeboom LW, van de Zande L, 2010. Genetics of sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea). *J. Genet.*, 89(3): 333-339.

Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW, 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*, 114(4): 419-429.

Beye M, Moritz RF, Epplen C, 1994. Sex linkage in the honeybee *Apis mellifera* detected by multilocus DNA fingerprinting. *Naturwissenschaften*, 81(10): 460-462.

Beye M, Moritz RFA, Crozier RH, Crozier YC, 1996. Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*, 83(9): 424-426.

Beye M, Page RE, Fondrk MK, Grohmann L, Moritz R, Hunt GJ, 1999. Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Genetics*, 153(4): 1701-1708.

Beye M, Seelmann C, Gempe T, Hasselmann M, Vekemans X, Fondrk MK, Page RE, 2013. Gradual molecular evolution of a sex determination switch through incomplete penetrance of femaleness. *Curr. Biol.*, 23(24): 2559-2564.

Butcher RDG, Whitfield WGF, Hubbard SF, 2000. Complementary sex determination in the genus *Diadegma* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Evol. Biol.*, 13(4): 593-606.

Cho S, Huang ZY, Green DR, Smith DR, Zhang J, 2006. Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: balancing selection and trans-species polymorphisms. *Genome Res.*, 16(11): 1366-1375.

Cho S, Huang ZY, Zhang J, 2007. Sex-specific splicing of the honeybee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. *Genetics*, 177(3): 1733-1741.

Cook JM, 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity*, 71(4): 421-435.

Cristino AS, Nascimento AM, Costa LF, Simoes ZL, 2006. A comparative analysis of highly conserved sex-determining genes between *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Res.*, 5(1): 154-168.

Crozier RH, 1971. Heterozygosity and sex determination in haplo-diploidy. *Am. Nat.*, 105(945): 399-412.

Crozier RH, 1977. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 22: 263-288.

Erdman SE, Burtis KC, 1993. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain. *EMBO J.*, 12(2): 527-535.

Estrada B, Casares F, Sánchez-Herrero E, 2003. Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*. *Differentiation*, 71(6): 299-310.

Gempe T, Beye M, 2011. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays*, 33(1): 52-60.

Gempe T, Hasselmann M, Schiott M, Hause G, Otte M, Beye M, 2009. Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. *PLoS Biol.*, 7(10): e1000222.

Hasimoto H, 1933. The role of the W-chromosome in the sex determination of *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.*, 8: 245-247.

Hasselmann M, Beye M, 2004. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(14): 4888-4893.

Hasselmann M, Beye M, 2006. Pronounced differences of recombination activity at the sex determination locus of the honeybee, a locus under strong balancing selection. *Genetics*, 174(3): 1469-1480.

Hasselmann M, Gempe T, Schiott M, Nunes-Silva CG, Otte M, Beye M, 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature*, 454(7203): 519-522.

Herrick G, Seger J, 1999. Imprinting and paternal genome elimination in insects. *Results Probl. Cell. Differ.*, 25: 41-71.

Holloway AK, Strand MR, Black WT, Antolin MF, 2000. Linkage analysis of sex determination in *Bracon* sp. near *hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Genetics*, 154(1): 205-212.

Hunt GJ, Page RJ, 1994. Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol. Gen. Genet.*, 244(5): 512-518.

Hunt GJ, Page RJ, 1995. Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics*, 139(3): 1371-1382.

Hunter MS, 1993. Origin of males by genome loss in an autoparasitoid wasp. *Heredity*, 70(2): 162-171.

Inga N, Miriam M, Martin B, 2012. The *Am-tra*2 gene is an essential regulator of female splice regulation at two levels of the sex determination hierarchy of the honeybee. *Genetics*, 192(3): 1015-1026.

Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H, Arai Y, Ishihara G, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Suzuki MG, Katsuma S, 2014. A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509(7502): 633-636.

Koch V, Nissen I, Schmitt BD, 2014. Independent evolutionary origin of *fem* paralogous genes and complementary sex determination in hymenopteran insects. *PLoS ONE*, 9(4): e91883.

Nur U, Werren JH, Eickbush DG, Burke WD, Eickbush TH, 1988. A "selfish" B chromosome that enhances its transmission by eliminating the paternal genome. *Science*, 240(4851): 512-514.

Page REJr, Marks RW, 1982. The population genetics of sex determination in honey bees: random mating in closed populations. *Heredity*, 48(2): 26-29.

Perlman SJ, Kelly S, Zchori-Fein E, Hunter MS, 2006. Cytoplasmic incompatibility and multiple symbiont infection in the ash whitefly parasitoid, *Encarsia inaron*. *Biol. Control*, 39(3): 474 – 480.

Poirié M, Périquet G, Beukeboom L, 1992. The hymenopteran way of determining sex. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 3: 357 – 361.

Salz HK, Maine EM, Keyes LN, Samuels ME, Cline TW, Schedl P, 1989. The *Drosophila* female specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation. *Genes Dev.*, 3: 708 – 719.

Súnchez L, 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.*, 52: 837 -856.

Sawanth SK, Gopinath G, Sambrani N, 2016. The autoregulatory loop: a common mechanism of regulation of key sex determining genes in insects. *J. Biosci.*, 41(2): 283 – 294.

Snell GD, 1935. The determination of sex in *Habrobracon*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 21(7): 446 – 453.

Stouthamer R, 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73: 317 – 327.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 71 – 102.

Stouthamer R, van Tilborg M, de Jong JH, Nunney L, Luck RF, 2001. Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. *Proc. Biol. Sci.*, 268(1467): 617 – 622.

Suzuki MG, Imanishi S, Dohmae N, Asanuma M, Matsumoto S, 2010. Identification of a male-specific RNA binding protein that regulates sex-specific splicing of *Bmdsx* by increasing RNA binding activity of BmPSI. *Mol. Cell. Biol.*, 30(24): 5776 – 5786.

Suzuki MG, Imanishi S, Dohmae N, Nishimura T, Shimada T, Matsumoto S, 2008. Establishment of a novel in vivo sex-specific splicing assay system to identify a trans-acting factor that negatively regulates splicing of *Bombyx mori dsx* female exons. *Mol. Cell. Biol.*, 28(1): 333 – 343.

van Wilgenburg E, Driessen G, Beukeboom LW, 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an "unintelligent" design? *Front. Zool.*, 3: 1.

Verhulst EC, Lynch JA, Bopp D, 2013. A new component of the *Nasonia* sex determining cascade is maternally silenced and regulates *transformer* expression. *PLoS ONE*, 8(5): e63618.

Weis JJ, Ode PJ, Heimpel GE, 2017. Balancing selection maintains sex determining alleles in multiple-locus complementary sex determination. *Evolution*, 71(5): 1246 – 1257.

Werren JH, Skinner SW, Charnov EL, 1981. Paternal inheritance of a daughterless sex ratio factor. *Nature*, 293(5832): 467 – 468.

Whiting PW, 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics*, 28(5): 365 – 382.

Whiting RGSA, 1947. Reproductive economy in the chalcidoid wasp *Melittobia*. *Genetics*, 32(1): 29.

Yokoyama S, Nei M, 1979. Population dynamics of sex-determining alleles in honey bees and self-incompatibility alleles in plants. *Genetics*, 91(3): 609 – 626.

Zareba J, Blazej P, Laszkiewicz A, Sniezewski L, Majkowski M, Janik S, Cebrat M, 2017. Uneven distribution of complementary sex determiner (*csd*) alleles in *Apis mellifera* population. *Sci. Rep.*, 7(1): 2317.

Zayed A, Packer L, 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(30): 10742 – 10746.

（责任编辑：赵利辉）